

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12Q 1/68, C07K 15/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/25708 (43) Date de publication internationale: 23 décembre 1993 (23.12.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00540 (22) Date de dépôt international: 4 juin 1993 (04.06.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/06888 5 juin 1992 (05.06.92) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA) [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75341 Paris Cédex 07 (FR). INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON (INA) [FR/FR]; 16, rue Claude-Bernard, F-75231 Paris Cédex 05 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : DARRASSE, Armelle [FR/FR]; Inarre, F-40350 Pouillon (FR). KOTOUJANSKY, Alain [FR/FR]; 34, rue Abel-Hovelacque, F-75013 Paris (FR). BERTHEAU, Yves [FR/FR]; 1, rue Vulpian, F-75013 Paris (FR).		(74) Mandataire: DEMACHY, Charles; Grosset-Fournier & Demachy sarl, 103, rue La Fayette, F-75010 Paris (FR). (81) Etats désignés: CA, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: NUCLEOTIDIQUE SEQUENCES OBTAINED FROM GENES CODING PECTATE-LYASES, AND UTILIZATIONS THEREOF PARTICULARLY FOR THE DETECTION OF BACTERIA OF THE GENUS <i>ERWINIA</i> (54) Titre: SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES ISSUES DE GENES CODANT DES PECTATE-LYASES, ET LEURS UTILISATIONS NOTAMMENT POUR LA DETECTION DE BACTERIES DU GENRE <i>ERWINIA</i> (57) Abstract <p>The present invention relates to a method for identification and detection of pectinolytic bacteria of the genus <i>Erwinia</i> of predetermined species, subspecies or pathovar, and more particularly of the species <i>Erwinia chrysanthemi</i> and of the species <i>Erwinia carotovora</i>, in the ground or in the water, or in a host susceptible of being the carrier of such bacteria, particularly in plants and seeds, such process comprising assaying for fragments of DNA or RNA, which are specific of the concerned species, coding a pectate-lyase (PL), through a molecular hybridization with at least one specific probe, such hybridization being preceded by an amplification of the number of copies of the above-mentioned DNA fragments by means of specific primers. The invention also relates to probes and primers as well as to kits containing them for implementing such method.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention a pour objet un procédé d'identification et de détection de bactéries pectinolytiques du genre <i>Erwinia</i> d'une espèce, sous-espèce ou pathovar déterminés, et plus particulièrement de l'espèce <i>Erwinia chrysanthemi</i> et de l'espèce <i>Erwinia carotovora</i>, dans le sol ou l'eau, ou chez un hôte susceptible d'être porteur de telles bactéries, notamment chez les plantes et les semences, ce procédé consistant à rechercher les fragments d'ADN ou d'ARN, spécifiques de l'espèce concernée, codant une pectate-lyase (PL), en mettant en jeu une hybridation moléculaire avec au moins une sonde spécifique, cette hybridation étant précédée par une amplification du nombre de copies des fragments d'ADN susmentionnés à l'aide d'amorces spécifiques. L'invention vise également les sondes et les amorces ainsi que des kits les contenant pour la mise en œuvre de ce procédé.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Allemagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
FI	Finlande				

**SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES ISSUES DE GENES CODANT DES
PECTATE-LYASES, ET LEURS UTILISATIONS NOTAMMENT POUR
LA DETECTION DE BACTERIES DU GENRE *ERWINIA*.**

5

La présente invention a pour objet des séquences nucléotidiques issues de gènes codant des pectate-lyases, et utilisables, notamment en tant que sondes et amorces, pour la détection de bactéries pectinolytiques du genre *Erwinia* chez des hôtes susceptibles d'être infectés par ces dernières, ou dans tout milieu où ces bactéries sont susceptibles de survivre.

10

Une étude effectuée en 1988 indiquait que les pertes mondiales dues aux maladies des plantes s'élevaient couramment à 60 milliards de dollars par an. C'est dire l'importance que représente la détection rapide et spécifique des agents phytopathogènes, qui conditionne, entre autres, les choix des produits phytosanitaires, de leur dosage et du moment de leur application.

15

Les mesures prophylactiques, nécessitant donc une détection rapide, sensible et fiable, constituent encore de nos jours un des moyens les plus efficaces et les moins coûteux, tant au niveau financier qu'à celui de l'environnement, de lutte contre les maladies, et en particulier les bactérioses contre lesquels peu de moyens de lutte sont disponibles, l'utilisation d'antibiotiques étant prohibée dans la majorité des pays. Ces mesures prophylactiques consistent essentiellement en l'utilisation de plantes, boutures ou semences (pris au sens large du terme) saines, après avoir détruit ou refusé les lots contaminés, en stérilisation ou tout autre procédé de désinfection de l'ensemble des matériaux susceptibles d'être en contact avec les plantes et les semences.

20

25

Le dépistage des pathologies d'origine bactérienne chez les plantes n'a cependant pas été satisfaisant jusqu'à présent, et des pertes importantes de plantes mono et dicotylédones dans les champs, dans les serres ou durant leur stockage sont fréquemment observées.

30

Une des causes principales de ce problème est l'utilisation de semences et boutures apparemment saines, mais qui sont en réalité porteuses de bactéries susceptibles d'être à l'origine du développement futur de pathologies chez les plantes obtenues à partir de ces semences. On parlera alors de bactéries en phase latente d'infection.

35

De nombreuses pathologies de plantes sont caractérisées par une phase latente d'infection. Durant cette phase, le niveau d'infection est généralement inférieur à celui qui pourrait être détecté par inspection visuelle (absence de

symptômes apparents) ou par les techniques courantes disponibles actuellement (isolement et caractérisation microbiologique, immunologie...).

Une autre source importante de contamination des plantes viendrait également de l'environnement naturel ou artificiel, notamment des sols et de l'eau.

Il faut noter également que l'isolement et la caractérisation microbienne sont en général des techniques longues et laborieuses, susceptibles d'être d'un coût trop élevé pour envisager de les appliquer à grande échelle, tandis que les méthodes immunologiques ne présentent pas toujours la spécificité et la sensibilité désirées.

Les bactéries pectinolytiques du genre *Erwinia* (encore désignées ci-après *erwinias*) sont responsables d'un grand nombre de ce type de pathologies, dont l'un des symptômes est la macération des tissus chez un grand nombre de plantes, boutures et semences (terme pris au sens large). Ces bactéries sont notamment capables d'infecter la pomme de terre, le maïs, la tomate, la betterave à sucre, le chou, l'endive, etc..., ainsi que les plantes ornementales de serres, telles que les plantes ornementales, et d'une manière générale toute plante couramment échangée sur le marché entre les pays européens et des pays tiers.

Parmi ces *erwinias* pectinolytiques, on peut citer principalement d'une part *Erwinia carotovora*, et plus particulièrement *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc), *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca), *Erwinia carotovora* subsp. *odorifera* (Eco), et *Erwinia carotovora* subsp. *wasabiae* (Ecw), et d'autre part, *Erwinia chrysanthemi* (Ech).

Ces bactéries produisent plusieurs enzymes extracellulaires capables d'attaquer les composants de la paroi cellulaire; pectinases, cellulases, hémicellulases et protéases (pour une revue détaillée, voir l'article de A. Kotoujansky paru dans Annu. Rev. Phytopathol. 1987, 25: 405-30).

Parmi ces enzymes, les pectate-lyases (encore désignées par polygalacturonate-lyases, pectate-transéliminases, polygalacturonate-transéliminases, poly(1,4- α -D-galacturonide)lyase, et EC 4.2.2.2) participeraient au mécanisme de cette macération des plantes, sans pour autant être les seuls agents responsables de ce phénomène, et ne seraient pas toutes nécessaires à la virulence de ces bactéries.

Par pectate-lyases on entend toute enzyme capable, par le biais d'une réaction de β -élimination, de couper une liaison α 1->4 O glycosidique présente entre deux résidus galacturoniques.

Ces pectate-lyases (encore désignées ci-après par PL) sont principalement codées par des gènes *pel* nommés *pelY* (Manulis *et al.*, 1988), *pelB* (Lei *et al.*, 1987), *pelA* (Lei *et al.*, 1988), *pelI* (Ito *et al.*, 1988), *pel153* (Trollinger *et al.*, 1989), *pelA*, *pelC*, *pelE* et *pelD* (Tamaki *et al.*, 1988), *pelA*, *pelD* et *pelE* (Van Gijsegem, 1989), *pelB* (Schoedel et Collmer, 1986), *pelA* (Favey *et al.*, 1992) et *pelB* (Hinton *et al.*, 1989).

Ces gènes ont eux-mêmes été regroupés en trois familles en fonction de leurs homologues de séquences (Hinton *et al.*, 1989). Il a en effet été déterminé que la famille *pelA*, *D*, *E* est présente chez *Ech*, et la famille *pelB*, *C*, *I*, *X*, est présente chez *Eca*, *Ecc* et *Ech*, et que la famille *pel153*, *Y* est présente chez certaines souches d'*Erwinia carotovora*.

Il convient cependant de noter que ces gènes ne sont pas spécifiques des erwinias pectinolytiques. En effet, d'autres bactéries, telles que *Yersinia pseudotuberculosis* (*Yps*), *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas* sp., sont capables de produire des PL. La famille *pel153*, *Y* aurait été mise en évidence chez *Yps*; une partie du gène *pel153* serait effectivement commune à *Eca* et *Yps* (Trollinger *et al.*, 1989).

La présence de séquences conservées tant au niveau des séquences nucléotidiques que protéiques correspondant à ces PL, serait à l'origine de l'apparition de réactions croisées lors de la mise en oeuvre de méthodes de détection des erwinias, que ces méthodes procèdent par hybridation entre acides nucléiques, ou par réaction immunologique à l'aide d'anticorps anti-PL.

C'est principalement cette possibilité de réactions croisées qui est à l'origine du fait qu'aucune méthode de diagnostic des pathologies causées par ces erwinias pectinolytiques, procédant par l'intermédiaire de séquences nucléotidiques correspondant à ces PL, n'a été envisagée.

Quant aux méthodes de diagnostic immunologiques de ces pathologies par détection de ces PL, outre ce problème de réactions croisées (donnant lieu à l'apparition de faux positifs ou de faux négatifs), elles présentent également l'inconvénient de ne pas permettre le diagnostic précoce des pathologies en question, compte tenu du fait que la présence de ces PL dans le milieu étudié est concomitante à l'apparition des premiers symptômes de ces pathologies.

La présente invention a précisément pour but de mettre à la disposition d'utilisateurs potentiels, des méthodes fiables d'identification et de détection de bactéries pectinolytiques du genre *Erwinia* d'une espèce déterminée, et plus particulièrement, de l'espèce *Erwinia chrysanthemi* et de l'espèce *Erwinia carotovora*, ainsi que de leurs sous-espèces et pathovars.

5 L'invention a plus précisément pour but de fournir de nouvelles séquences nucléotidiques utilisables en tant que sondes ou amorces pour la mise en oeuvre de ces méthodes, notamment par les techniques procédant par hybridation entre acides nucléiques (ARN et/ou ADN), suivie de l'amplification du nombre de copies de séquences cibles (ou de leurs séquences complémentaires) à détecter, par exemple suivant les techniques d'amplification génique dites PCR (Polymerase Chain Reaction), LCR (Ligase Chain Reaction), Q β -replicase et 3SR (Self-Sustained Sequence Replication).

10 L'invention a également pour but l'application des méthodes susmentionnées au diagnostic précoce des pathologies causées par les erwinias pectinolytiques, à savoir des méthodes permettant de faire le diagnostic du risque d'apparition de ces pathologies chez les plantes, ou d'apprécier les risques de contamination des plantes, notamment à partir du sol ou de l'eau.

15 L'invention a également pour but de mettre à la disposition d'utilisateurs potentiels, des kits pour la mise en oeuvre des méthodes susmentionnées.

20 L'invention a également pour but l'utilisation des séquences nucléotidiques susmentionnées pour la détection du polymorphisme des gènes codant des pectate-lyases chez les erwinias pectinolytiques, afin d'identifier les espèces, les sous-espèces et pathovars de ces bactéries, mais aussi afin de déterminer l'origine géographique et la spécificité d'hôte des souches de ces espèces, sous-espèces et pathovars, et de fournir des méthodes de diagnostic des pathologies causées spécifiquement par ces espèces, sous-espèces et pathovars, ou en association avec d'autres.

25 La présente invention sera plus particulièrement illustrée à l'aide des figures suivantes:

- figure 1: séquence nucléotidique du gène *pel153* de la souche EC153 d'*Erwinia carotovora*,
- figure 2: séquence nucléotidique du gène *pelE* de la souche EC16 d'*Erwinia chrysanthemi*,
- 30 - figure 3: carte de sites de restriction correspondant aux profils obtenus avec (a) *Sau3A1*, (b) *HaeII*, (c) *AluI* et (d) *HpaII* chez *Erwinia carotovora*. La carte est représentée seulement entre les deux amorces dans la région amplifiée du gène *pel*.

35 La présente invention a pour objet un procédé d'identification et de détection de bactéries pectinolytiques du genre *Erwinia* d'une espèce déterminée, et plus particulièrement de l'espèce *Erwinia chrysanthemi* et de l'espèce *Erwinia carotovora*, dans tout milieu susceptible de contenir de telles bactéries, notamment dans le sol ou l'eau, ou chez un hôte susceptible d'être

porteur de telles bactéries, notamment chez les plantes, les boutures, et les semences, ce procédé consistant à rechercher les fragments d'ADN ou d'ARN, spécifiques de l'espèce concernée, codant une pectate-lyase (PL), en mettant en jeu une hybridation moléculaire avec au moins une sonde spécifique, cette hybridation étant précédée par une amplification du nombre de copies des fragments d'ADN susmentionnés à l'aide d'amorces spécifiques.

L'invention concerne plus particulièrement les séquences nucléotidiques correspondant à tout ou partie des gènes qui, au sein du génome des *erwinias* pectinolytiques, codent des PL, ces séquences nucléotidiques étant utilisables en tant qu'amorces et/ou sondes pour la mise en oeuvre du procédé susmentionné de l'invention.

A ce titre l'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation, aux fins susmentionnées, de séquences nucléotidiques correspondant à tout ou partie des phases ouvertes de lecture des gènes codant des PL chez *Erwinia carotovora* et *Erwinia chrysanthemi* (notamment du gène *pel153* représenté sur la figure 1, de la souche EC153 d'*Eca*, du gène *pelA* de la souche 3937 d'*Ech* décrite dans l'article de Favey *et al.* susmentionné, du gène *pelE* de la souche EC16 d'*Ech* représenté sur la figure 2).

Par séquences nucléotidiques correspondant à tout ou partie de gènes qui, au sein des génomes des bactéries pectinolytiques du genre *Erwinia*, codent des pectate-lyases, on entend plus particulièrement:

- soit celles correspondant à l'identique à tout ou partie d'un des brins des séquences d'ADN des gènes codant des PL, ou à tout ou partie des séquences d'ARN messager (ARNm) issues de ces gènes,

- soit celles susceptibles de s'hybrider avec tout ou partie des séquences d'ARNm ou d'un des brins d'ADN susmentionnés. A titre illustratif, les conditions de l'hybridation susmentionnée sont suffisamment stringentes de manière à ce que l'hybridation obtenue résiste à deux lavages successifs d'environ 15 mn chacun dans une solution 3 x SSC (0,5M NaCl, 0,05M citrate de sodium) à une température d'environ 65°C; avantageusement, ces séquences comprennent au moins environ 40% de nucléotides identiques aux séquences d'ADN et d'ARNm susmentionnées.

L'invention a plus particulièrement pour objet toute séquence nucléotidique comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique A suivante:

5 ' -TTACCGGACGCCGAGCTGTGGCGT-3 '

ou sa séquence complémentaire, ou une séquence dérivée de la séquence A, notamment par suppression et/ou substitution et/ou addition de nucléotides, et susceptible de s'hybrider avec le fragment délimité par les positions 1231 et 1254 de la séquence représentée sur la figure 1, ou la séquence complémentaire de cette séquence dérivée.

L'invention a également pour objet toute séquence nucléotidique comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique B choisie parmi tout ou partie:

* des enchaînements de nucléotides suivants:

5 ' -CAGGAAGATGTCGTTATCGCGAGT-3 '

.....C.....

.....T.....

ou leurs séquences complémentaires,

* ou d'une séquence dérivée de la séquence B, notamment par suppression et/ou substitution et/ou addition de nucléotides, et susceptible de s'hybrider avec la séquence complémentaire du fragment délimité par les positions 1642 et 1665 de la séquence représentée sur la figure 1, ou la séquence complémentaire de cette séquence dérivée.

L'invention vise également toute séquence nucléotidique comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique C choisie parmi tout ou partie:

* des enchaînements de nucléotides suivants:

5 ' -GATCAGAAAGCCCGCAGCCAGAT-3 '

.....A.....T.....

.....G..T.....

(les points représentant des nucléotides identiques à ceux de la première ligne) ou leurs séquences complémentaires,

* ou d'une séquence dérivée de la séquence C, notamment par suppression et/ou substitution et/ou addition de nucléotides, et susceptible de s'hybrider avec le fragment délimité par les positions 295 et 317 de la séquence représentée sur la figure 2, ou la séquence complémentaire de cette séquence dérivée.

L'invention concerne également toute séquence nucléotidique comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique D choisie parmi tout ou partie:

* des enchaînements de nucléotides suivants:

5' - CTGTGGCCGATCAGGATGGTTTTGTCGTGC - 3'

5 ...A.....A...
 T.....C.....
 A..A.....C.....
 A.....

ou leurs séquences complémentaires,

10 * ou d'une séquence dérivée de la séquence D, notamment par suppression et/ou substitution et/ou addition de nucléotides, et susceptible de s'hybrider avec la séquence complémentaire du fragment délimité par les positions 672 et 701 de la séquence représentée sur la figure 2, ou la séquence complémentaire de cette séquence dérivée.

15 A titre illustratif, on entend en outre par séquence dérivée dans ce qui précède, et ce qui suit, toute séquence comprenant des nucléotides tels que l'uracile, l'inosine, le 7 deaza 2' desoxyguanosine triphosphate (cdGTP) etc..., et correspondant donc soit à un ADN soit à un ARN modifié.

20 Les séquences nucléotidiques susmentionnées peuvent être avantageusement marquées, notamment de manière radioactive, enzymatique, par un composé fluorescent, par liaison à une molécule antigénique (susceptible d'être reconnue par des anticorps) ou à toute autre molécule susceptible d'être directement ou indirectement détectée à l'aide de réactifs, cette liaison pouvant éventuellement être effectuée par l'intermédiaire d'un bras espaceur, notamment par l'intermédiaire d'une séquence nucléotidique constituée d'environ 5 à 100
 25 nucléotides située à l'extrémité 3' ou 5' de ces séquences.

30 A titre d'exemples de molécules directement ou indirectement détectables liées aux séquences nucléotidiques susmentionnées, on peut citer l'acétylaminofluorène, la biotine (détectée à l'aide de l'avidine, la streptavidine) ou encore la digoxigénine.

35 Les séquences nucléotidiques susmentionnées peuvent être utilisées par paires pour former ce que l'on appellera dans la suite de ce texte des couples d'amorces, ces amorces permettant l'amplification (ou encore la multiplication) du nombre de copies de tout ou partie des gènes, ou des copies des ARN correspondants et de leurs dérivés nucléotidiques par transcription inverse, codant des PL chez les erwinias pectinolytiques, notamment selon la technique PCR qui sera détaillée plus loin ou toute autre technique faisant appel à l'hybridation entre séquences nucléotidiques et permettant de détecter un nombre initialement faible de séquences nucléotidiques déterminées (ou de leurs

séquences complémentaires), par multiplication du nombre de copies de ceux-ci ou de leurs dérivés, ces amorces étant le cas échéant marquées, notamment de la manière indiquée ci-dessus.

5 Avantageusement, les amorces selon l'invention sont constituées d'environ 5 à environ 100 nucléotides, et de préférence d'environ 15 à environ 30 nucléotides, et sont susceptibles de s'hybrider avec une région de ces gènes codant des PL chez ces *erwinias* pectinolytiques, cette région étant différente selon les amorces au sein d'un même couple, de manière à permettre l'amplification soit des gènes entiers, soit de fragments de ces gènes, ces
10 fragments étant constitués d'environ 150 à environ 700 nucléotides, et avantageusement d'environ 400 à environ 500 nucléotides.

L'invention a plus particulièrement pour objet les couples d'amorces pour l'amplification génique spécifique des *Erwinia carotovora* (*Ec*), caractérisés en ce que l'une des amorces de ces couples est choisie parmi les séquences
15 comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique A, ou une séquence dérivée, telle que définie ci-dessus, tandis que l'autre amorce est choisie parmi les séquences comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique B, ou une séquence dérivée, telle que définie ci-dessus.

L'invention a également plus particulièrement pour objet les couples d'amorces pour l'amplification génique spécifique des *Ech*, caractérisés en ce que l'une des amorces de ces couples est choisie parmi les séquences
20 comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique C, ou une séquence dérivée, telle que définie ci-dessus, tandis que l'autre amorce est choisie parmi les séquences comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique D, ou une séquence dérivée, telle que définie ci-dessus.
25

De préférence les amorces selon l'invention comprennent les 3, et de préférence les 5 derniers nucléotides des extrémités 3' des séquences (A, B, C et D) décrites ci-dessus.

Les séquences nucléotidiques susmentionnées peuvent également être
30 utilisées en tant que sondes, le cas échéant marquées, notamment de la manière indiquée ci-dessus, ces sondes étant susceptibles de s'hybrider avec tout ou partie des gènes, ou des ARN correspondants, ou de leurs dérivés nucléotidiques par transcription inverse, codant des pectate-lyases chez les *erwinias* pectinolytiques.

35 Avantageusement les sondes de l'invention sont constituées d'environ 10 à environ 500 nucléotides.

Dans le cadre de l'utilisation des séquences susmentionnées en tant que sondes pour l'identification et la détection des *Erwinia carotovora*, des

5 séquences particulièrement préférées comprennent au moins environ 10 nucléotides de la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 1613 et 1707 de la séquence représentée sur la figure 1, ou au moins environ 10 nucléotides ayant un minimum de 40% d'homologie avec la séquence susmentionnée, ou encore toute séquence susceptible de rester hybridée avec celles définies ci-dessus, notamment dans les conditions d'hybridation décrites plus haut.

10 A titre illustratif, les séquences A et B, ou toute séquence dérivée, telle que décrite ci-dessus, représentent des sondes particulièrement avantageuses pour la détection d'*Erwinia carotovora*, et plus particulièrement d'*Ecc*, d'*Eca*, d'*Eco* et d'*Ecw*, ou de toute espèce, sous-espèce ou pathovar, actuels ou dérivés ultérieurement par modification de la taxonomie actuelle.

15 Dans le cadre de l'utilisation des séquences susmentionnées en tant que sondes pour l'identification et la détection des *Erwinia chrysanthemi*, des séquences particulièrement préférées sont constituées d'au moins environ 10 nucléotides:

- de la séquence représentée sur la figure 2 et délimitée par les nucléotides situés aux positions 295 et 701 du gène *pelE* de la souche EC16 d'*Ech*,
- ou de la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 130 à 20 970 du gène *pelA* de la souche 3937 d'*Ech* décrite dans l'article de Favey *et al.* susmentionné,

ou d'au moins 10 nucléotides ayant un minimum de 40% d'homologie avec les séquences susmentionnées, ou encore toute séquence susceptible de rester hybridée avec celles définies ci-dessus, notamment dans les conditions d'hybridation décrites plus haut.

25 A titre illustratif, les séquences C et D, ou toute séquence dérivée, telles que décrites ci-dessus, représentent des sondes particulièrement avantageuses pour la détection d'*Ech* ou de toute espèce, sous-espèce ou pathovar, actuels ou dérivés ultérieurement par modification de la taxonomie actuelle.

30 Le procédé d'identification et de détection des erwinias pectinolytiques selon l'invention, comprend avantageusement les étapes suivantes:

- le traitement d'un échantillon prélevé dans l'eau, ou le sol, ou chez un hôte, notamment chez les plantes et les semences, de manière à rendre le génome de ces erwinias accessible aux sondes et/ou aux amorces de l'invention, et le cas échéant à toute ADN ou ARN polymérase permettant de répliquer les deux brins de l'ADN génomique, ou l'ARN en dérivant, ce traitement étant 35 notamment effectué par ébullition, macération (dans un liquide tel que l'eau), broyage, sonication, notamment en présence de détergent (par exemple

laurylsulfate, Sodium Dodecyl Sulfate, Triton X100), d'antioxydant, de chélateurs, d'alcali, et/ou de composés éliminant des inhibiteurs tels que les polyphénols (polyvinylpyrrolidone par exemple), ou les polysaccharides (bromure de cétyltriméthylammonium par exemple),

5 - l'amplification du nombre de copies de gènes codant des PL, ou de fragments de ces gènes, susceptibles d'être présents dans cet échantillon, à l'aide de couples d'amorces (ou de leurs séquences dérivées ou complémentaires) tels que définis ci-dessus,

10 - la détection de fragments amplifiés lors de l'étape précédente, témoignant de la présence de gènes codant des PL, et donc de la présence d'*erwinias* pectinolytiques dans l'échantillon étudié.

L'étape d'amplification génique peut être réalisée *in vitro* ou *in vivo* par toute méthode utilisant les techniques classiques d'amplification enzymatique de l'ADN ou de l'ARN, telles que la technique LCR (Ligase Chain Reaction) 15 décrite notamment dans la revue P.N.A.S., USA, 88, pp. 189-193 (1991), ou la technique "Q β Replicase" décrite dans la revue Biotechnology (Vol.6, octobre 1988), ou avantageusement la technique PCR telle que décrite notamment dans les demandes de brevet européen de Cetus (n° 200 362, 201 184, 229 701 et 258 017), ou encore la technique 3SR décrite par Fahy et *al.* dans *PCR Meth. Appl.* 1, 25-33 (1991), ou les techniques dérivées de ces dernières et toute 20 méthode visant à amplifier *in vitro* les séquences nucléotidiques.

A titre illustratif, l'amplification de ces gènes, ou fragments de gènes, comprend avantageusement les étapes suivantes:

25 - la prédénaturation de l'ADN double brin en ADN mono-brin, de préférence dans un tampon constitué de Tris-HCl 10 mM pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% de gélatine, de co-facteurs de l'ADN-polymérase, notamment d'ions Mg²⁺ et K⁺, des 4 désoxynucléotides constitutifs des ADN (dCTP, dATP, dGTP, dTTP), et des couples d'amorces tels que définis ci-dessus, par chauffage entre environ 80°C et environ 110°C, avantageusement à 30 100°C; cette étape peut-être réalisée pendant environ 2 mn à environ 7 mn, avantageusement pendant 5 mn,

- l'amplification proprement dite par addition au milieu obtenu à l'étape précédente d'ADN polymérase thermorésistante par exemple, et

35 * chauffage à environ 94°C, ce qui correspond à l'étape de dénaturation proprement dite; cette étape peut-être réalisée pendant environ 10 s à environ 2 mn,

* puis chauffage entre environ 60°C et environ 76°C, ce qui correspond à l'étape d'hybridation des couples d'amorces avec les gènes codant des PL, ou

des fragments de ces gènes, susceptibles d'être présents dans l'échantillon biologique étudié; cette étape peut-être réalisée pendant environ 10 s à environ 3 mn,

5 * et enfin chauffage entre environ 50°C et environ 76°C, ce qui correspond à l'étape d'élongation des amorces, hybridées à l'étape précédente, l'une vers l'autre, produisant ainsi des séquences nucléotidiques complémentaires de tout ou partie des séquences génomiques des *Erwinias* pectinolytiques, ces dernières séquences étant délimitées par les nucléotides s'hybridant avec les amorces susmentionnées; cette étape peut-être réalisée
10 pendant environ 10 s à environ 3 mn,

- la répétition de l'étape d'amplification précédente entre environ 20 et environ 50 fois, avantageusement entre 25 et 35 fois,

- le cas échéant, la récupération d'une partie aliquote du milieu obtenu à la fin de l'étape d'amplification précédente, afin de réaliser une nouvelle
15 amplification selon la méthode décrite ci-dessus.

Il va de soi que tous les intervalles de temps précisés dans les méthodes détaillées ci-dessus, peuvent varier en fonction de l'appareillage (dit cycleur ou thermocycleur) utilisé.

Bien entendu, dans le cadre de l'amplification du nombre de copies par multiplication d'un fragment d'ARN, les 4 désoxynucléotides utilisés dans la
20 méthode précédente sont dUTP, dCTP, dGTP, dATP.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la sensibilité de la détection peut être améliorée en poursuivant le procédé décrit ci-dessus par une amplification du type "nested PCR", décrite dans "PCR A Practical Approach"
25 Edited by M.J.McPherson, P.Quirke, G.R.Taylor, page 42, (1991) Oxford University Press, en utilisant des amorces internes au fragment précédemment amplifié, ce qui conduit à l'amplification du nombre de copies d'un fragment d'ADN ou d'ARN plus court que celui dont le nombre de copies a été initialement amplifié.

30 La détection des gènes ou fragments de gènes susmentionnés peut être réalisée par électrophorèse sur gel de tout ou partie du milieu réactionnel dans lequel l'amplification a été effectuée. La visualisation d'un amas important (plus ou moins individualisé) de séquences en un point spécifique du gel, et correspondant au nombre de copies de tout ou partie des gènes ainsi amplifiées,
35 est corrélable à la présence des gènes susmentionnés dans l'échantillon étudié.

Avantageusement, le nombre amplifié de copies de tout ou partie des gènes sus-mentionnés, est susceptible d'être détecté à l'aide de sondes telles que décrites ci-dessus, notamment selon le procédé décrit ci-dessous.

Dans le cas d'utilisation de sondes, la détection des fragments de gènes amplifiés peut être réalisée soit à l'aide d'une sonde (hybridation simple), notamment par utilisation d'amorces ou nucléotides marqués, soit à l'aide de deux sondes (hybridation double).

5 A titre illustratif, le procédé de l'invention par hybridation double, est avantageusement réalisé de la manière suivante:

- après avoir rendu accessible le génome des bactéries dans les échantillons, on procède à l'amplification selon la technique décrite ci-dessus, puis on procède:

10 - à la fixation sur un support solide (tel qu'une membrane ou des puits de plaques de microtitration comme celles couramment utilisées dans la technique dite ELISA, et adaptées ou non aux acides nucléiques) d'une séquence nucléotidique "piège", choisie parmi les sondes de l'invention décrites ci-dessus, avec laquelle les susdits gènes, ou fragments de ces gènes, sont susceptibles de
15 s'hybrider, notamment dans les conditions définies ci-dessus, cette fixation étant réalisée selon des techniques usuelles décrites notamment par Maniatis *et al.*, 1982,

- au rinçage du support solide,

- à la saturation des sites réactifs libres du support,

20 - à l'incubation des séquences pièges, ainsi fixées, avec l'ADN (ou ARN) génomique amplifié, provenant de l'échantillon biologique préalablement traité de la manière indiquée ci-dessus, dans des conditions permettant l'hybridation de l'ADN (ou ARN) susmentionnés avec lesdites séquences pièges, notamment dans les conditions d'hybridation définies plus haut,

25 - au rinçage du support solide, notamment à l'aide de 6xSSC à 65°C (ou 3xSSC à 65°C, ou 0,1xSSC si nécessaire, à 68°C) pendant 15 mn à deux reprises,

- à l'incubation des séquences d'ADN ou ARN susmentionnées, hybridées à l'étape précédente avec les séquences pièges, avec une ou plusieurs sondes
30 selon l'invention, ces sondes étant choisies de manière à ce qu'elles ne soient pas complémentaires des séquences pièges susmentionnées, dans des conditions permettant l'hybridation des séquences d'ADN ou ARN amplifiées susmentionnées avec lesdites sondes, notamment dans les conditions d'hybridation définies plus haut,

35 - au rinçage du support solide, notamment dans les conditions susmentionnées,

- à la détection des éventuelles sondes étant restées fixées, par hybridation avec les séquences nucléotidiques amplifiées, sur le support solide après l'étape

précédente, témoignant alors de la présence d'ADN (ou ARN) génomique susmentionnés dans l'échantillon biologique, cette détection étant réalisée soit directement lorsque les susdites sondes sont marquées de manière radioactive ou fluorescente, soit indirectement par l'intermédiaire de réactifs eux-mêmes susceptibles de reconnaître ces sondes, notamment à l'aide d'anticorps ou autres réactifs décrits précédemment, dans le cas où ces sondes sont marquées par des antigènes ou des molécules susceptibles d'être respectivement reconnus par ces anticorps ou ces réactifs.

Avantageusement, les deux sondes utilisées dans le cadre de la détection par hybridation double peuvent être à spécificité variable. Par exemple, on peut utiliser à titre de sonde piège, une sonde spécifique d'une espèce déterminée, et plus particulièrement de l'espèce *Erwinia carotovora* ou de l'espèce *Erwinia chrysanthemi*. La seconde sonde utilisée dans le procédé par hybridation double décrit ci-dessus, pourra être choisie parmi les sondes spécifiques des sous-espèces ou pathovars des espèces susmentionnées.

D'autres méthodes de détection ou de dosage, en phase solide ou liquide, peuvent bien entendu être envisagées dans le cadre de la présente invention.

Ces méthodes sont décrites notamment dans l'article de Bloch, 1991, qui traite de la technique PCR en général et d'une méthode de dosage par co-amplification applicable au dosage des erwinias pectinolytiques présentes dans l'échantillon étudié, ou dans l'article de Barany, 1991, traitant de la LCR et de la PCR, ou encore dans l'article de Gilliland et al., 1990, traitant d'une méthode PCR par compétition pour la quantification d'ARNm également applicable dans le cadre de la présente invention.

L'invention vise plus particulièrement un procédé tel que décrit ci-dessus, permettant l'identification et la détection d'*Erwinia carotovora*, et plus particulièrement d'*Ecc*, d'*Eca*, d'*Eco* et d'*Ecw*, ou de toute espèce, sous-espèce ou pathovar, actuels ou dérivés ultérieurement par modification de la taxonomie actuelle, ce procédé étant caractérisé en ce que:

- les couples d'amorces utilisés sont constitués d'une séquence nucléotidique A ou dérivée, et d'une séquence nucléotidique B ou dérivée, telles que définies ci-dessus,

- les séquences pièges et les sondes sont choisies parmi les séquences comprenant au moins 10 nucléotides de la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 1231 et 1665 de la séquence représentée sur la figure 1.

Avantageusement, les étapes de dénaturation, d'hybridation et d'élongation du procédé susmentionné, sont respectivement réalisées à 94°C pendant 1 mn, à 65°C pendant 1 mn, et à 72°C pendant 1 mn 30 s.

L'invention concerne également un procédé tel que décrit ci-dessus, permettant l'identification et la détection d'*Ech* ou de toute espèce, sous-espèce ou pathovars, actuels ou dérivés ultérieurement par modification de la taxonomie actuelle, ce procédé étant caractérisé en ce que :

5 - les couples d'amorces utilisés sont constitués d'une séquence nucléotidique C ou dérivée, et d'une séquence nucléotidique D ou dérivée, telles que définies ci-dessus,

 - les séquences pièges et les sondes sont choisies parmi les séquences comprenant au moins 10 nucléotides de la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 295 et 701 de la séquence représentée sur la figure 2.

10 Avantageusement, dans le cas du procédé susmentionné, l'étape de dénaturation est réalisée à 94°C pendant 1 mn, et les étapes d'hybridation et d'élongation sont regroupées en une étape réalisée à 72°C pendant 2 mn.

15 L'invention a également pour objet l'application des procédés d'identification et de détection susmentionnés à la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic de l'éventuelle apparition (encore désignée par méthode de diagnostic précoce) de pathologies causées par les *erwinias* pectinolytiques, et plus particulièrement par les *Erwinia carotovora* et les *Erwinia chrysanthemi*, chez un hôte tel que défini ci-dessus, cet hôte étant susceptible d'être un porteur apparemment sain de telles bactéries et se trouvant en phase latente d'infection.

20 Le résultat de la méthode de diagnostic susmentionnée permet d'évaluer le risque que présente un hôte susceptible d'être porteur d'*erwinias* pectinolytiques, et plus particulièrement d'*Ec* et d'*Ech*, de développer et le cas échéant, de transmettre, ou non, une pathologie causée par ces bactéries.

25 L'invention vise également l'application des procédés décrits ci-dessus au dépistage des *erwinias* pectinolytiques dans tout milieu susceptible de les contenir, notamment dans le sol et l'eau, et de représenter ainsi des sources possibles de contamination.

30 Par *erwinias* pectinolytiques détectées dans le cadre des méthodes de diagnostic et de détection susmentionnées, il faut entendre à la fois les souches naturelles de ces bactéries, ainsi que les souches bactériennes, et autres organismes, modifiés, notamment par voie du génie génétique.

 Les pathologies en phase latente d'infection susceptibles d'être dépistées dans le cadre de la présente invention sont plus particulièrement:

35 - des maladies génériques dites de pourritures (humides ou molles), à développement localisé et/ou systémique, de plantes entières ou d'organes au champ ou en conservation ou encore en survie. A titre d'exemples, on peut citer les pourritures de la pomme de terre (plantes ou tubercules), de chicons

d'endives ou d'endives en forçage ou stockées, de Saintpaulia, de toute salade, d'organes végétaux ayant éventuellement subi (encore désignés par produits de 4° gamme) des modifications d'eux-mêmes ou de leur environnement (atmosphères modifiées, lavages, désinfection etc...),

5 - de pourritures dites systémiques individualisées telles que la jambe noire ou le manque à la levée de la pomme de terre,

 - de flétrissement se caractérisant par un port inhabituel des plantes, généralement observé après obstruction des vaisseaux du végétal, notamment par empêchement de la circulation d'une ou des deux sèves (notamment chez la
10 pomme de terre et l'oeillet).

 L'invention a également pour objet des kits pour la mise en oeuvre d'un procédé ou d'une méthode de diagnostic selon l'invention, ces kits comprenant au moins une séquence nucléotidique choisie parmi celles définies ci-dessus et correspondant à tout ou partie de gènes qui, au sein des génomes des erwinias
15 pectinolytiques, codent des pectate-lyases.

 L'invention a plus particulièrement pour objet des kits comprenant:

 - au moins un couple d'amorces dont l'une est constituée de tout ou partie de la séquence A ou d'une séquence dérivée de cette dernière, et l'autre est constituée de tout ou partie de la séquence B ou d'une séquence dérivée de cette
20 dernière, telles que décrites ci-dessus, ou de leurs séquences complémentaires, ce couple d'amorces permettant l'amplification génique de séquences nucléotidiques d'*Erwinia carotovora*, notamment des *Eca*, *Eco*, *Ecc* et *Ecw*,

 - une (ou plusieurs) sonde(s) susceptibles de s'hybrider avec tout ou partie des fragments de gènes amplifiés à l'aide des couples d'amorces susmentionnés,
25 et plus particulièrement des sondes comprenant au moins 10 nucléotides de la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 1231 et 1665 de la séquence représentée sur la figure 1

 L'invention vise également des kits comprenant:

 - un couple d'amorces dont l'une est constituée de tout ou partie d'une séquence C ou d'une séquence dérivée de cette dernière, et l'autre est constituée de tout ou partie d'une séquence D ou d'une séquence dérivée de cette dernière, telles que décrites ci-dessus, ou de leurs séquences complémentaires, ce couple d'amorces permettant l'amplification génique de séquences nucléotidiques
30 d'*Erwinia chrysanthemi*,

 - une (ou plusieurs) sonde(s) susceptibles de s'hybrider avec tout ou partie des fragments de gènes amplifiés à l'aide des couples d'amorces susmentionnés, et plus particulièrement des sondes comprenant au moins 10 nucléotides de la
35

séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 295 et 701 de la séquence représentée sur la figure 2.

Les kits selon l'invention peuvent également comprendre:

- une ADN ou ARN polymérase thermorésistante,
- 5 - un milieu réactionnel avantageusement constitué de Tris-HCl 10 mM pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% de gélatine, de co-facteurs de l'ADN-polymérase, notamment d'ions Mg²⁺ et K⁺, et des 4 désoxynucléotides constitutifs des ADN (dCTP, dATP, dGTP, dTTP) ou des ARN (dCTP, dATP, dGTP, dUTP).

10 L'invention concerne également l'utilisation de séquences nucléotidiques correspondant à tout ou partie de gènes qui, au sein des génomes des bactéries pectinolytiques du genre *Erwinia*, et plus particulièrement d'*Erwinia carotovora* et d'*Erwinia chrysanthemi*, codent des pectate-lyases, pour la mise en oeuvre d'un procédé d'identification des sous-espèces, et/ou des souches ou pathovars des espèces ou sous-espèces, des différentes bactéries du genre *Erwinia*.

15 L'invention a également pour objet l'utilisation de séquences nucléotidiques, telles que définies ci-dessus, correspondant à tout ou partie de gènes qui, au sein des génomes des bactéries pectinolytiques du genre *Erwinia*, codent des pectate-lyases, pour la mise en oeuvre d'une méthode de détection du polymorphisme des fragments amplifiés, celui-ci pouvant par exemple être mis en évidence par le polymorphisme de taille des fragments de restriction issus des gènes susmentionnés amplifiés, ces fragments (encore désignés fragments de référence dans ce qui suit) étant caractéristiques de chacune des espèces, sous-espèces ou pathovars d'une même espèce de bactéries pectinolytiques du genre *Erwinia*.

25 Avantageusement, la détection des fragments amplifiés sera effectuée par hybridation avec des sondes à spécificité plus ou moins large en fonction des espèces, sous-espèces ou pathovars des erwinias pectinolytiques. Cette détection peut être réalisée selon la méthode RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), ou par détection en phase solide (par hybridation simple ou double telles que décrites ci-dessus) telle que par exemple celle décrite par Erlich, Gibbs et Kazajian, Eds (1989) dans Current Communications in Molecular Biology. Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor laboratory Press NY.

35 A ce titre, l'invention concerne plus particulièrement les fragments de référence obtenus, chez *Erwinia carotovora*, par restriction avec les enzymes *Sau3A1* et *HaeII* et représentés sur la figure 3.

L'invention vise plus particulièrement les sondes aptes à mettre en évidence le polymorphisme observé avec *Sau3A1* et *HaeII*, dans le cas d'*Eca*.

5 L'invention a plus particulièrement pour objet un procédé d'identification et de détection d'une souche d'une espèce ou sous-espèce ou pathovar déterminé de bactéries pectinolytiques du genre *Erwinia* chez un hôte, notamment chez les plantes et les semences, ce procédé étant réalisé par la mise en oeuvre d'un des procédés d'identification et de détection décrits précédemment et comprenant une étape de détection de la souche susmentionnée.

10 Cette étape d'identification des souches des espèces, sous-espèces et pathovars susmentionnés, peut représenter une étape supplémentaire dans le cadre des procédés d'identification et de détection susmentionnés. Les procédés sus-mentionnés se font alors en deux temps; détection de la présence éventuelle d'*erwinias* pectinolytiques, suivie de la détection ou de la discrimination de l'espèce, sous-espèce ou pathovar en question.

15 Cette étape de détection de ces souches peut également remplacer l'étape de détection des *erwinias* dans les procédés susmentionnés, de manière à ce que l'espèce ou sous-espèce en question éventuellement présente dans le milieu biologique soit directement détectée.

20 La détection des souches des espèces, sous-espèces ou pathovars, est avantageusement réalisée de la manière suivante:

- mise en présence des gènes ou fragments de gènes codant des PL chez les *erwinias* pectinolytiques susceptibles d'être présentes dans l'échantillon étudié, et dont le nombre de copies a été le cas échéant amplifié, avec une (ou plusieurs) enzyme(s) de restriction susceptible(s) de couper ces gènes ou fragments de gènes en un (ou plusieurs) site(s) spécifique(s) d'une espèce, sous-espèce ou pathovar déterminé d'*Erwinia*, puis comparaison de la taille des fragments de restriction obtenus à l'étape précédente avec celle de fragments de référence caractéristiques de l'espèce ou sous-espèce déterminée susmentionnée, tels que les fragments de référence décrits ci-dessus, notamment par électrophorèse sur gel,

30 - ou détection de sites de restriction polymorphes à l'aide de sondes spécifiques des souches des sous-espèces ou pathovars en question, notamment selon la méthode décrite à la page 200 du livre d'Erlich "PCR Technology" (1989) Stockton Press,

35 - ou encore par comparaison de la température de fusion de domaines des fragments obtenus avec celle des fragments de référence; cette technique peut avantageusement être réalisée par électrophorèse sur gel, en milieu dénaturant, ou non, homogène ou en gradient continu ou discontinu (composé par exemple

d'urée, de formamide etc ...), ou en gradient de température, notamment selon les techniques décrites dans Current Communication in Molecular Biology, Polymerase Chain Reaction, édité par H. A. Erlich, R. Gibbs et H. H. Kazazian, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

5 La détection peut également être réalisée à l'aide d'amorces prises dans les régions polymorphes mises en évidence par les enzymes de restriction susmentionnées.

10 Avantageusement la détection des souches d'espèces, des sous-espèces ou des pathovars des bactéries pectinolytiques du genre *Erwinia* est réalisée selon la technique LCR telle que décrite ci-dessus, ou une technique dérivée de (ou apparentée à) cette dernière, notamment de la manière suivante:

15 - mise en présence des gènes ou fragments de gènes codant des PL, dont le nombre de copies a été le cas échéant amplifié, lors de la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic de l'invention telle que décrite ci-dessus, avec un (ou plusieurs) couple(s) de séquences oligonucléotidiques, chacune de ces séquences étant constituée d'environ 10 à environ 30 nucléotides et étant susceptible de s'hybrider de part et d'autre d'un (ou plusieurs) nucléotide(s) de ces gènes ou fragments de gènes, ce (ou ces) dernier(s) nucléotide(s) étant caractéristique(s) de la souche de l'espèce, sous-espèce ou pathovar d'*Erwinia*
20 en question, et en particulier de part et d'autre des séquences caractéristiques des sites de restriction des enzymes utilisées pour la détermination de cette souche (espèce, sous-espèce ou pathovar), dans des conditions permettant l'hybridation de ces gènes ou fragments de gènes avec ce (ou ces) couple(s) de séquences, notamment dans les conditions d'hybridation définies ci-dessus,

25 - addition d'une ligase, par exemple thermorésistante, de sorte que ce (ou ces) couple(s) de séquences puisse(nt) donner naissance à une ou des séquences uniques constituées de chacune des deux séquences de ces couples et du (ou des) nucléotide(s) complémentaire(s) de celui (ou ceux) susmentionné(s) caractéristique(s) de la souche d'*Erwinia* en question, sous l'action de cette
30 ligase, lorsque les deux séquences du (ou des) couple(s) sont hybridées aux gènes ou fragments de gènes susmentionnés,

 - amplification par ligation, avec les étapes nécessaires de dénaturation, d'hybridation et d'aboutage, du nombre de copies de ces séquences uniques, notamment suivant les techniques décrites ci-dessus,

35 - détection de ces séquences uniques, cette détection étant avantageusement réalisée par électrophorèse, ou de préférence à l'aide de sondes spécifiques marquées ou non (hybridation simple) ou susceptibles d'être

reconnues par des réactifs marqués (hybridation double par exemple) de la manière décrite ci-dessus.

Par nucléotides caractéristiques d'une espèce ou sous-espèce d'*Erwinia*, on entend tout nucléotide qui, dans une position déterminée d'un gène codant une pectate-lyase de cette espèce, sous-espèce ou pathovar d'*Erwinia*, est différent des nucléotides situés à la même position dans ce même gène chez les autres espèces, sous-espèces ou pathovars d'*Erwinia*. Ces nucléotides présentent également la propriété de modifier la capacité d'une enzyme de restriction à couper le fragment cible ou amplifié de l'échantillon étudié.

L'invention concerne plus particulièrement les couples de séquences nucléotidiques tels que décrits ci-dessus pour la mise en oeuvre de la méthode susmentionnée de détection des espèces, sous-espèces ou pathovars de bactéries du genre *Erwinia*, ces séquences étant avantageusement choisies parmi celles bordant les sites *Sau3A1* et *HaeII* des gènes codant des PL chez ces espèces, sous-espèces ou pathovars d'*Erwinia*.

L'invention a également pour objet des kits pour la mise en oeuvre des méthodes de diagnostic susmentionnées de pathologies causées spécifiquement par une espèce, sous-espèce ou pathovar déterminés d'*Erwinia*, ces kits comprenant, outre tout ou partie des kits décrits ci-dessus:

- une (ou plusieurs) sonde(s) oligonucléotidique(s), marquée(s) ou non, fixée(s) ou non sur un support solide, spécifique(s) d'une région nucléotidique caractéristique d'une espèce, sous-espèce ou pathovar déterminé de bactéries du genre *Erwinia*,

- le cas échéant, une ou plusieurs enzymes de restriction, et avantageusement des fragments de restriction de référence tels que décrits ci-dessus,

- et/ou une ligase et un (ou plusieurs) couple(s) de séquences oligonucléotidiques, tel(s) que décrit(s) ci-dessus, susceptibles de s'hybrider de part et d'autre d'un (ou plusieurs) nucléotide(s) situé(s) dans des gènes ou fragment de gènes codant des pectate-lyases, et étant caractéristique(s) d'une espèce, sous-espèce ou pathovar d'*Erwinia*.

L'invention concerne également l'utilisation des séquences nucléotidiques définies ci-dessus pour la mise en oeuvre d'un procédé de détection, le cas échéant dans un but de diagnostic, chez un hôte ou dans un milieu tels que définis ci-dessus, de tout micro-organisme ou toute cellule, d'eucaryotes par exemple, dans les génomes desquels les séquences nucléotidiques décrites ci-dessus, ont été introduites de façon transitoire ou définitive. A nouveau, un tel

procédé est avantageusement réalisé suivant l'un des procédés d'identification et de détection décrits ci-dessus.

5 A ce titre, l'invention a également pour objet l'utilisation des séquences nucléotidiques définies ci-dessus correspondant à tout ou partie des gènes codant des PL chez les *erwinias* pectinolytiques, en tant que marqueurs de cellules, d'eucaryotes par exemple, ou de micro-organismes génétiquement modifiés par introduction dans leur génome de ces séquences nucléotidiques, ou d'hôtes cellulaires infectés (ou transformés) par de tels micro-organismes, notamment pour le suivi de l'évolution de ces cellules, micro-organismes et hôtes cellulaires
10 dans un environnement déterminé.

L'invention concerne également tout procédé d'obtention des séquences nucléotidiques susmentionnées.

Concernant la préparation des séquences nucléotidiques de l'invention, celle-ci peut être effectuée soit par un procédé chimique, soit par d'autres
15 procédés, comme l'amplification par LCR ou PCR ou autre méthode d'amplification génique.

Un mode de préparation approprié des séquences nucléotidiques (comportant au maximum environ 200 nucléotides, ou paires de bases (pb) lorsqu'il s'agit de séquences nucléotidiques bicaténaires) de l'invention par voie
20 chimique comprend les étapes suivantes:

- la synthèse d'ADN en utilisant par exemple la méthode automatisée β -cyanéthyl phosphoramidite décrite dans *Bioorganic Chemistry* 4; 274-325, 1986,
- le clonage des ADN ainsi obtenus dans un vecteur, notamment plasmidique, approprié et la récupération des ADN par hybridation avec une
25 sonde appropriée, ou par électrophorèse, généralement après restriction, suivie d'une élution des fragments.

Un mode de préparation, par voie chimique, de séquences nucléotidiques de longueur supérieure à environ 200 nucléotides - ou pb (lorsqu'il s'agit de séquences nucléotidiques bicaténaires) comprend les étapes suivantes:

- 30 - l'assemblage, par exemple par aboutage (ou ligation, par action d'une ligase), d'oligonucléotides synthétisés chimiquement, pourvus à leurs extrémités de sites de restriction adéquats, selon le principe décrit dans *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 80; 7461-7465, 1983,
- 35 - le clonage des ADN ainsi obtenus dans un vecteur, notamment plasmidique, approprié et la récupération des ADN par hybridation avec une sonde appropriée, ou par électrophorèse, généralement après restriction, suivie d'une élution des fragments.

La préparation des séquences nucléotidiques de l'invention peut également être réalisée par voie biologique, notamment après transformation et clonage d'hôtes cellulaires susceptibles de contenir ces séquences nucléotidiques, et de permettre la multiplication de ces dernières.

5 Un autre procédé d'obtention consiste en l'amplification du nombre de copies d'une séquence nucléotidique déterminée à l'aide d'amorces appropriées telles que décrites ci-dessus, notamment selon la technique PCR réalisée à partir de gènes ou fragments de gènes codant des PL chez les *erwinias* pectinolytiques.

10 L'invention sera davantage détaillée dans les exemples qui suivent de mise en oeuvre de méthodes de détection par PCR de bactéries pectinolytiques du genre *Erwinia*.

A) Matériel et méthodes

15 Souches bactériennes: des souches de sous espèces d'*Erwinia carotovora*, et de l'espèce *Erwinia chrysanthemi*, ainsi que d'autres micro-organismes ont été utilisés (voir Tableaux 1 et 2).

Isolement d'ADN Chromosomique:

20 Les bactéries sont cultivées à 30°C dans un milieu de Luria (milieu L) (Miller, 1972) pendant une nuit. Deux millilitres de cultures sont centrifugés pour l'extraction de l'ADN par la méthode de Klotz et Zimm (1972) modifiée : les réactifs sont réduits d'un facteur 10.

25 Analyse de séquences: des résultats publiés ont été utilisés: *pelY* (Manulis *et al.*, 1988), *pelB* (Lei *et al.*, 1987), *pelA* (Lei *et al.*, 1988), *pell* (Ito *et al.*, 1988), *pel153* (Trollinger *et al.*, 1989), *pelA*, *pelC*, *pelE* et *pelD* (Tamaki *et al.*, 1988), *pelA*, *pelD* et *pelE* (Van Gijsegem, 1989), *pelB* (Schoedel et Collmer 1986), *pelA* (Favey *et al.*, 1992) et *pelB* (Hinton *et al.*, 1989).

30 Les séquences nucléotidiques des gènes *pel* ont été étudiées dans le cadre de lecture ouverte (ORF), alignées par paires, en utilisant un ensemble de programmes d'analyse de séquences (GCG: Genetic Computer Group, Université du Wisconsin). Les régions conservées dans différentes souches de sous espèces d'*Erwinia carotovora* (*Ec*), et de l'espèce *Erwinia chrysanthemi*, et celles différentes des autres espèces ont été plus particulièrement étudiées.

Les amorces ont été choisies à l'aide des critères suivants:

- 35
- ces amorces doivent être suffisamment éloignées pour permettre l'amplification de fragments porteurs de polymorphisme,
 - ces amorces ne doivent cependant pas être trop éloignées de manière à assurer une amplification rapide des fragments en question,

- les 3 (et si possible 5) derniers nucléotides de l'extrémité 3' des amorces doivent être invariants et donc strictement complémentaires de la partie correspondante des fragments à amplifier.

5 Les amorces trouvées dans le cadre de la présente invention sont distantes d'environ 400 à 500 nucléotides des fragments à amplifier.

Parmi les amorces trouvées, les amorces A, B, C et D susmentionnées représentent des amorces particulièrement avantageuses.

Dans le cas d'*Ec*, deux oligonucléotides (24 mères) distants d'environ 400 pb sont choisis comme amorces de PCR:

10 5'-TTACCGGACGCCGAGCTGTGGCGT-3' (amorce A) et
5'-CAGGAAGATGTCGTTATCGCGAGT-3' (amorce B).

Dans le cas d'*Ech*, deux séries d'oligonucléotides (l'une de 23 mères, l'autre de 30 mères) distants d'environ 400 pb sont choisis comme amorces de PCR:

15 5'-GATCAGAAAGCCCGCAGCCAGAT-3' (amorce C),
5'-CTGTGGCCGATCAGGATGGTTTTGTCGTGC-3' (amorce D)

20 Une spécificité théorique de ces amorces est vérifiée vis-à-vis des banques de données complètes de Genbank et EMBL, pour une homologie (complète ou partielle) permettant jusqu'à 5 nucléotides différents (mismatch).

Amplification d'ADN: le protocole de PCR utilisé est dérivé de celui recommandé par Perkin-Elmer Cetus Corporation. La réaction a lieu dans un volume de 50 μ l avec 50 μ l d'huile minérale (Sigma).

25 Pour ce qui concerne *Ec*, le mélange est soumis à 25 cycles des incubations suivantes : 1 mn à 94°C, 1 mn à 65°C, 1 mn 30s à 72°C (Pharmacia LKB Gene ATAQ Controller DFAT 70-01-101).

30 Pour *Ech* ces 25 cycles sont effectués de la manière suivante: 1 mn à 94°C, 2 mn à 72°C. L'analyse initiale des produits de PCR est faite par électrophorèse sur des minigels d'agarose à 1 % (p/v).

Analyse des fragments de restriction :

35 Les produits de PCR sont précipités à l'éthanol et resuspendus dans 20 μ l de tampon TE (Tris EDTA) (Maniatis, 1982). Les enzymes de restriction utilisés dans le cas d'*Ec* sont *AluI*, *HaeII*, *SauA1*, *HpaII*, *TaqI*, *HaeIII* et *HhaI* de Boehringer. La restriction a lieu dans un volume de 15 μ l, avec 5 μ l d'ADN pendant 1 ou 2 heures, à 37°C. Dans le cas d'*Ech* ces enzymes sont: *Sau3A1*, *AluI* et *HpaII*. La totalité du volume est soumise à une électrophorèse sur gel

d'acrylamide à 6% (solution mère: 28% d'acrylamide, Appligène, 2% bis, Biorad), dans un tampon TBE (Tris Borate EDTA) (Maniatis, 1982) à 250 volts pendant 1 heure. Le gel est coloré par du bromure d'éthidium (2 mg/l), puis rincé. Un μg de marqueur V (Boehringer) et une échelle d'ADN de 1kb (BRL) sont utilisés comme marqueurs de taille.

B) Résultats :

Essai de PCR :

Les amorces A et B ont été expérimentées dans un premier temps pour 6 souches bactériennes pour leur spécificité avec des conditions de température variables.

Les meilleures conditions d'amplification déterminées (avec un appareil Pharmacia) sont: 94°C 1 min, 65°C 1 min, 72°C 1 min 30s, 25 cycles. Une collection de microorganismes est examinée pour la spécificité de ce protocole PCR (Voir tableau 1). Parmi cette collection, toutes les souches d'*Eca*, *Ecc*, *Eco* et *Ecw*, présentent un fragment amplifié de 434 pb. Aucune des souches *Ecb* (*Erwinia carotovora* subsp. *betavascularum*), *Ech* ou autres espèces d'*Erwinia* telles que *herbicola* ou *rhapontici* ne sont détectées. Les autres microorganismes expérimentés ne présentent pas de signal positif. Ces amorces, dans ces conditions de PCR, permettent la détection spécifique de quatre des actuelles sous-espèces d'*Erwinia carotovora* pectinolytiques, notamment sur la pomme de terre.

Les meilleures conditions d'amplification déterminées (avec un appareil Pharmacia) pour les amorces C et D sont les suivantes: 94°C 1 min et 72°C 2 min.

A l'aide des amorces C et D, les souches *Ech* sont détectées spécifiquement et ainsi des erwinias pathogènes sur les pommes de terre ont pu être détectées avec une discrimination possible entre les espèces *chrysanthemi* et *carotovora*. En raison des différences physiologiques, géographiques et du pouvoir pathogène des deux espèces, ces tests PCR peuvent jouer un rôle important, notamment pour la certification des semences et boutures.

Ceci étant, l'essai effectué sur *Erwinia carotovora* ne permet pas de différencier les souches les plus pathogènes sur pomme de terre dans les champs (principalement *Eca*) des autres souches responsables, entre autres, des maladies de stockage (*Ecc*). Pour cette raison, une étude RFLP sur la région amplifiée est entreprise pour rechercher un polymorphisme éventuellement corrélé au pouvoir pathogène, la taxonomie, la région géographique d'isolement.

Analyse RFLP:

Les fragments amplifiés de 434 pb de la collection des souches *Ec* sont restreints avec plusieurs enzymes: *TaqI* et *HaeIII* ne donnent pas de polymorphisme lorsqu'ils sont testés sur une collection de souches variées.

5 *HhaI* donne plus de 15 profils sur une gamme de 30 souches représentatives des souches d'*Ec*. *AluI*, *HaeIII*, *Sau3A1* et *HpaII* donnent 3 à 5 profils différents (figure 3) pour la totalité de la collection (environ 100 souches). Les résultats globaux sont représentés au tableau 1. L'enzyme *Sau3A1* permet l'identification des souches *Eca* isolées à partir de pomme de terre (profil IV de la figure 3),

10 agents responsables chez cette dernière de la jambe noire typique. Deux souches d'*Eca* isolées de tomate ont le profil IV également, mais ces souches sont également responsables de symptômes de jambe noire sur tomate et pomme de terre lorsqu'elles sont inoculées (Samson et al., 1989). Il pourrait s'agir de souches d'*Eca* spécifiques des pommes de terre et trouvées incidemment sur des tomates ou, peut être, n'existe-t-il de réelle différence dans le pouvoir pathogène

15 d'*Eca* pour ces deux espèces végétales proches taxonomiquement.

Une exception est constituée par la souche 89.19 isolée de la pomme de terre en Argentine qui ne présente pas le profil IV. Cette souche appartient au profil II comme les souches *Eca*, 1H et 40H, atypiques isolées de l'eau en

20 Espagne. Ces souches présentent en commun d'autres caractéristiques comme la faculté de croître à 37°C (les souches d'*Eca* typiques ne le font pas) et ne donnent pas les symptômes typiques de la jambe noire lorsqu'elles sont inoculées à des plants de pomme de terre. Ces souches ne semblent donc pas appartenir à la sous-espèce *atroseptica*.

25 Dans cet essai PCR, la restriction par *Sau3A1* donne des résultats homogènes pour l'identification de l'agent typique de la jambe noire. D'un point de vue diagnostic, la seule utilisation du test PCR pourrait donner une bonne estimation des risques encourus au champ et en stockage. Les informations obtenues par l'utilisation de *Sau3A1*, et donc du polymorphisme indiqué par

30 cette enzyme, permettent d'identifier spécifiquement les agents typiques de la jambe noire.

Les profils obtenus à l'aide des enzymes *Sau3A1*, *HpaII* et *AluI* à partir de gènes codant des PL chez *Ech*, permettent de distinguer des souches d'*Ech* en fonction de leurs hôtes d'origine, et plus particulièrement les pathovars, par

35 exemple *zeae* et *dianthicola*.

Pour *Ech*, on notera également qu'il y a une relation entre le type de profil obtenu et la plante d'origine, et plus particulièrement le pathovar. Par exemple avec l'enzyme *Sau3A1* permet d'identifier les souches spécifiques de l'oeillet,

du maïs, du Saintpaulia, du Dieffenbachia, du Philodendron; l'enzyme *AluI* permet d'identifier les souches du maïs.

Comme nous l'avons vu précédemment, les amorces A et B d'une part, et C et D d'autre part, sont respectivement spécifiques des *Ec* et des *Ech*. Il convient de noter que ces amorces ne permettent en aucun cas l'amplification d'*Erwinia herbicola*, *Erwinia rhapontici*, *Franckia*, *Pseudomonas* sp., *Xanthomonas campestris*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter* sp. (anciennement nommée *Corynebacterium*), des organismes fixateurs d'azote atmosphérique, des champignons et levures saprophytes de pomme de terre, et de *Yersinia* sp., certains de ces organismes produisant des pectate-lyases.

Tableau 1. Origines et sites de restriction des souches d'*Ec* utilisées dans l'étude PCR-RFLP.

(*: souches initialement déterminées par des critères phénotypiques comme appartenant à la sous-espèce *atroseptica*, classées actuellement parmi la sous-espèce *carotovora*)

	Souches	hôte	pays/année	Sites de Restriction			
				Sau3A1	HaeII	HpaII	AluI
				123456	123	123	12
	<i>atroseptica</i>						
20	88.33	pomme de terre	France, 1988	100011	100	100	00
	88.45	"	France, 1988	100011	100	100	00
	88.22a	"	France, 1988	100011	100	100	00
	88.24	"	France, 1988	100011	100	100	00
25	88.30a	"	France, 1988	100011	100	100	00
	87.7	"	France, 1987	100011	110	101	10
	87.13	"	France, 1987	100011	100	100	00
	87.16a	"	France, 1987	100011	100	100	00
	87.16b	"	France, 1987	100011	100	100	00
30	86.14.11	"	France, 1986	100011	100	100	00
	86.20	"	France, 1986	100011	100	100	00
	511	"	France, 1964	100011	100	100	00
	SF1.1	"	Allemagne	100011	100	100	00
	161	"	Pays Bas	100011	100	100	00
35	Cip114	"	Pérou	100011	100	100	00
	Cip125	"	Pérou	100011	100	100	00
	Cip131	"	Pérou	100011	100	100	00
	Cip026	"	Pérou	100011	110	101	10

5	SH164.4	"	Réunion, 1988	100011	100	100	00
	CH3	"	Suisse, 1985	100011	110	101	10
	CH5	"	Suisse, 1985	100011	100	100	00
	CH6	"	Suisse, 1985	100011	100	100	00
	SF18.296	"	Suisse, 1958	100011	100	100	00
10	1329	"	GB	100011	100	100	00
	1330	"	GB	100011	110	101	10
	SCRI1043	"	GB	100011	100	100	00
	1526	"	GB, 1957	100011	100	100	00
	1527	"	USA, 1973	100011	100	100	00
15	1525	"	USA, 1969	100011	100	100	00
	1453	tomate	France, 1973	100011	110	101	10
	1546	"	France, 1973	100011	110	101	10
	89.19*	pomme de terre	Argentine, 1989	111100	110	100	00
	1H*	eau	Espagne, 1989	111100	110	100	00
20	40H*	"	Espagne, 1989	111100	110	100	00
	<i>betavascularum</i>						
	2121	betterave	USA, 1972	?			
	2122	"	USA, 1972	?			
	1520	tournesol	Mexique	?			
25	<i>carotovora</i>						
	SH230.134	banane	Cuba	101000	101	100	00
	CM1	chou	Malawi, 1986	111100	100	100	10
	798	carotte	USA	111000	000	100	10
	CH15	celeri	Suisse, 1988	111000	000	100	10
30	1489	chrysanthème	France, 1971	111000	010	110	10
	1458	"	USA	111100	110	110	10
	Sh230.115	maïs	Cuba	101000	101	100	00
	1350	concombre	Italie	111100	110	100	00
	1285	cyclamen	Grèce	111000	000	100	00
35	SE99.1	endive	France, 1985	111100	110	100	00
	1488	iris	France, 1973	111000	000	100	10
	SB89.7	poireau	France, 1982	111000	000	100	10
	2046	pomme de terre	Danemark, 1952	111000	010	100	10
	88.22c	"	France, 1988	111000	000	100	10
	88.29a1	"	France, 1988	111000	000	100	00

	88.44	"	France, 1988	111000	010	110	10
	87.25	"	France, 1987	111100	110	100	10
	86.14.51	"	France, 1986	111000	000	100	10
	S99	"	France, 1977	111000	100	100	01
5	S101	"	France, 1977	111000	010	110	10
	76.26	"	France, 1976	111000	000	100	10
	PM2	"	Malawi, 1986	111100	000	100	11
	194	"	Maroc, 1963	101000	000	100	10
	Cip360	"	Pérou	111100	010	100	00
10	Cip361	"	Pérou	111100	010	100	00
	Cip009	"	Pérou	111000	110	100	00
	CH24	"	Suisse	111000	000	110	10
	CH26	"	Suisse, 1985	111000	010	110	10
	SCRI193	"	GB	111000	000	110	10
15	1336	"	GB	101000	000	100	10
	Si82.1	"	Vietnam, 1989	111100	110	100	00
	SG162.6	tournesol	France, 1987	111100	110	100	00
	1403	"	Yougoslavie, 1969	111000	010	110	00
	797	tabac	USA, 1951	111100	010	100	00
20	SG39.1	?	Réunion, 1987	101000	010	100	10
	SG39.3	?	Réunion, 1987	111100	110	100	00
	<i>odorifera</i>						
	1893	celeri	France, 1976	111000	110	110	10
	CH11	"	Suisse, 1985	111000	110	110	00
25	2155	endive	France, 1983	111000	110	100	00
	2154	"	France, 1982	111000	010	110	10
	1892	"	France, 1981	111000	000	100	00
	1959	"	France, 1980	111000	010	110	10
	1878	"	France, 1979	111000	010	110	10
30	1879	"	France, 1979	111000	110	100	00
	1880	"	France, 1979	111000	110	110	10
	1646.2	poireau	France, 1980	111000	110	110	10
	1654	"	France, 1980	111000	110	110	10
	CH4	laitue	Suisse, 1986	111000	010	110	10

Tableau 2: origines des souches d'*Ech* utilisées dans l'étude PCR-RFLP

	Souches	Origine géographique	Plante hôte
5	1200	Angleterre	Oeillet
	PD 846	"	"
	PD 863	"	"
	1151	Italie	"
	1985	France	"
10	795	"	"
	2021	"	"
	E II 34	"	"
	1240	Danemark	"
	1243	"	"
15	30119	Italie	"
	30121	"	"
	30122	"	"
	30110	"	"
	1441	U.S.A	"
20	1275	Angleterre	"
	1805	Danemark	Kalenchoe
	2598	Suisse	"
	3716	France	"
	30728	"	"
25	30732	"	"
	30739	"	"
	30736	"	"
	2982	"	"
	3367	"	Dahlia
30	2013	"	"
	722	"	Tomate
	SA86-10	"	"
	ET 1	Martinique	"
	ET 2	"	"
35	ET 11	"	"
	SH230-143	Cuba	"
	ET 5	"	"
	ET3	"	"

	G3	Guadeloupe	"
	1888	France	Pomme de terre.
	2288	"	"
	2015	"	"
5	2593	Perou	"
	Cip 367	"	"
	Cip 366	"	"
	2594	"	"
	2267	Australie	"
10	2711	"	"
	SF 18-538	Suisse	Endive
	SA77-2	France	"
	30608	"	Dieffenbachia
	2014	"	"
15	3642	"	"
	3665	"	"
	1237	Allemagne	"
	1870	C. d'Ivoire	"
	2051	U.S.A	"
20	1152	Italie	"
	1345	"	"
	ED1	Martinique	"
	B374	Comores	Pelargonium
	1269	"	"
25	30913	France	Saintpaulia
	3937	"	"
	30909	"	"
	30932	"	"
	30904	"	"
30	SH230-C126	Cuba	Tabac
	1891	Pays Bas	"
	SH230-C94	Cuba	"
	2048	U.S.A	Chrysanthème
	1242	"	"
35	1346	Italie	"
	1270	Danemark	Parthenium
	1236	U.S.A	"
	SF471	Pays Bas	Philodendron

	3805	France	"
	1248	U.S.A	"
	1245	"	"
	EP2	Martinique	"
5	SF487	Pays Bas	"
	1268	U.S.A	Mais
	1522	Colombie	"
	1596	France	"
	1499	"	"
10	1534	Zimbabwe	"
	1271	Egypte	"
	1528	U.S.A	"
	1529	"	"
	2052	"	"
15	2595	Kenya	"
	1889	Malaisie	Ananas
	1272	"	"
	1278	"	"
	1884	Guyane F	Brachiaria
20	1449	U.S.A	Aglaonema
	2040	Australie	Panicum
	1443	Pays Bas	Syngonium
	SF190-1	France	Tournesol
	SF142-1	La Reunion	Artichaut
25			

BIBLIOGRAPHIE

- Barany, 1991, Biochemistry, Vol 30, n°11, 2735
- Bloch, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 88, pp. 189- 193
- 5 - Favey *et al.*, 1992, Journal of General Microbiology, 138: 499-508
- Gilliland *et al.*, 1990, PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Edited by Innis, Gelfand, Sninsky, White. Academic Press Inc
- Hinton *et al.*, 1989, Molecular Microbiology, 3: 1785-1795
- Ito *et al.*, 1988, Agric. Biol. Chem., 52: 479-487
- 10 - Klotz and Zimm, 1972, J. Mol. Biol., 72: 779-800
- Lei *et al.*, 1987, Journal of Bacteriology, 169: 4379-4383
- Lei *et al.*, 1988, Gene, 62: 159-164
- Maniatis *et al.*, 1982, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 545 pp.
- 15 - Manulis, 1988, Journal of Bacteriology, 170: 1825-1830
- Miller, 1972, Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 466 pp.
- Samson *et al.*, 1989, Biochemical and serological diversity of *Erwinia chrysanthemi*, in Proc. 7th Int. Conf. Plant Path. Bact., Budapest, Hungary, pp: 895-900
- 20 - Schoedel and Collmer, 1986, Journal of Bacteriology, 167: 117-123
- Trollinger *et al.*, 1989, Molecular Plant Microbe Interactions, 2: 17-25
- Van Gijsegem, 1989, Molecular Microbiology, 3: 1415-1424.

REVENDICATIONS

5 1. Procédé d'identification et de détection de bactéries pectinolytiques du
genre *Erwinia* d'une espèce déterminée, et plus particulièrement de l'espèce
Erwinia chrysanthemi et de l'espèce *Erwinia carotovora*, dans le sol ou l'eau,
ou chez un hôte susceptible d'être porteur de telles bactéries, notamment chez
les plantes et les semences, ce procédé consistant à rechercher les fragments
10 d'ADN ou d'ARN, spécifiques de l'espèce, la sous-espèce ou du pathovar
concernés, codant une pectate-lyase (PL), en mettant en jeu une hybridation
moléculaire avec au moins une sonde spécifique, cette hybridation étant
précédée par une amplification du nombre de copies des fragments d'ADN
susmentionnés à l'aide d'amorces spécifiques.

15

2. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend tout ou
partie de la séquence nucléotidique A suivante:

5'-TTACCGGACGCCGAGCTGTGGCGT-3'

20

ou sa séquence complémentaire, ou une séquence dérivée de la séquence
A, notamment par suppression et/ou substitution et/ou addition de nucléotides,
et susceptible de s'hybrider avec le fragment délimité par les positions 1231 et
1254 de la séquence représentée sur la figure 1, ou la séquence complémentaire
de cette séquence dérivée.

25

3. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend tout ou
partie de la séquence nucléotidique B choisie parmi tout ou partie:

* des enchaînements de nucléotides suivants:

30

5' - CAGGAAGATGTCGTTATCGCGAGT - 3'

.....C.....

.....T.....

ou leurs séquences complémentaires,

35

* ou d'une séquence dérivée de la séquence B, notamment par suppression
et/ou substitution et/ou addition de nucléotides, et susceptible de s'hybrider avec
la séquence complémentaire du fragment délimité par les positions 1642 et 1665
de la séquence représentée sur la figure 1, ou la séquence complémentaire de
cette séquence dérivée.

4. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend tout ou partie de la séquence nucléotidique C choisie parmi tout ou partie:

* des enchainements de nucléotides suivants:

5

5' -GATCAGAAAGCCCGCAGCCAGAT-3'

.....A.....T.....

.....G..T.....

10

(les points représentant des nucléotides identiques à ceux de la première ligne) ou leurs séquences complémentaires,

* ou d'une séquence dérivée de la séquence C, notamment par suppression et/ou substitution et/ou addition de nucléotides, et susceptible de s'hybrider avec le fragment délimité par les positions 295 et 319 de la séquence représentée sur la figure 2, ou la séquence complémentaire de cette séquence dérivée.

15

5. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend tout ou partie de la séquence nucléotidique D choisie parmi tout ou partie:

* des enchainements de nucléotides suivants:

20

5' -CTGTGGCCGATCAGGATGGTTTTGTCGTGC-3'

..A.....A...

T.....C.....

.....A..A.....C.....

25

.....A.....

ou leurs séquences complémentaires,

* ou d'une séquence dérivée de la séquence D, notamment par suppression et/ou substitution et/ou addition de nucléotides, et susceptible de s'hybrider avec la séquence complémentaire du fragment délimité par les positions 672 et 701 de la séquence représentée sur la figure 2, ou la séquence complémentaire de cette séquence dérivée.

30

35

6. Couples d'amorces pour l'amplification génique, caractérisés en ce que l'une des amorces de ces couples est choisie parmi les séquences comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique A, ou une séquence dérivée, selon la revendication 2, tandis que l'autre amorce est choisie parmi les séquences comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique B, ou une séquence dérivée, selon la revendication 3.

5 7. Couples d'amorces pour l'amplification génique, caractérisés en ce que l'une des amorces de ces couples est choisie parmi les séquences comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique C, ou une séquence dérivée, selon la revendication 4 tandis que l'autre amorce est choisie parmi les séquences comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique D, ou une séquence dérivée, selon la revendication 5.

10 8. Sonde nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins 10 nucléotides de la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 1231 et 1665 de la séquence représentée sur la figure 1, ou au moins 10 nucléotides ayant au minimum 40% d'homologie avec la séquence susmentionnée.

15 9. Sonde nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins 10 nucléotides de la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 295 et 701 de la séquence représentée sur la figure 2, ou au moins 10 nucléotides ayant au minimum 40% d'homologie avec la séquence susmentionnée.

20 10. Séquences nucléotidiques selon l'une des revendications 2 à 9, caractérisées en ce qu'elles sont marquées, notamment de manière radioactive, enzymatique, par un composé fluorescent, par liaison à une molécule antigénique (susceptible d'être reconnue par des anticorps) ou à toute autre molécule susceptible d'être directement ou indirectement détectée à l'aide de réactifs, cette liaison pouvant être effectuée par l'intermédiaire d'un bras espaceur, notamment par l'intermédiaire d'une séquence nucléotidique constituée d'environ 5 à 100 nucléotides située aux extrémités 3' ou 5' de ces séquences.

30 11. Procédé d'identification et de détection selon la revendication 1, d'*Erwinia carotovora* dans le sol ou l'eau, ou chez un hôte, notamment chez les plantes et les semences, ce procédé comprenant les étapes suivantes:

35 - le traitement d'un échantillon prélevé dans l'eau, le sol ou chez cet hôte, de manière à rendre le génome d'*Erwinia carotovora* accessible aux amorces définies dans la revendication 6, et le cas échéant à toute ADN ou ARN polymérase permettant de répliquer les deux brins de l'ADN génomique ou l'ARN en dérivant, ce traitement étant notamment effectué par ébullition, macération (dans un liquide tel que l'eau), broyage, ou sonication,

- l'amplification du nombre de copies de fragments de gènes codant des PL, susceptibles d'être présents dans cet échantillon, à l'aide de couples d'amorces tels que définis ci-dessus,

5 - la détection de la présence éventuelle de gènes codant des PL, et donc de la présence d'*Erwinia carotovora* dans l'échantillon étudié, à l'aide d'une sonde selon la revendication 8, le cas échéant marquée, notamment de la manière indiquée dans la revendication 10.

10 12. Procédé d'identification et de détection selon la revendication 1, d'*Erwinia chrysanthemi* dans le sol ou l'eau, ou chez un hôte, notamment chez les plantes et les semences, ce procédé comprenant les étapes suivantes:

15 - le traitement d'un échantillon prélevé dans l'eau, le sol ou sur un hôte, de manière à rendre le génome des *Erwinia chrysanthemi* accessible aux amorces définies dans la revendication 7, et le cas échéant à toute ADN ou ARN polymérase permettant de répliquer les deux brins de l'ADN génomique ou l'ARN en dérivant, ce traitement étant notamment effectué par ébullition, macération (dans un liquide tel que l'eau), broyage, ou sonication,

20 - l'amplification du nombre de copies de fragments de gènes codant des PL, susceptibles d'être présents dans cet échantillon, à l'aide de couples d'amorces tels que définis ci-dessus,

25 - la détection de la présence éventuelle de gènes codant des PL, et donc de la présence d'*Erwinia chrysanthemi* dans l'échantillon étudié à l'aide d'une sonde selon la revendication 9, le cas échéant marquée, notamment de la manière indiquée dans la revendication 10.

30 13. Procédé selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que l'amplification du nombre de gènes codant des pectate-lyases comprend les étapes suivantes:

35 - la prédénaturation de l'ADN double brin en ADN mono-brin, de préférence dans un tampon constitué de Tris-HCl 10 mM pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% de gélatine, de co-facteurs de l'ADN (ou ARN)-polymérase, notamment d'ions Mg²⁺ et K⁺, des 4 désoxynucléotides constitutifs des ADN (dCTP, dATP, dGTP, dTTP), ou des ARN (dCTP, dUTP, dGTP, dTTP), et des couples d'amorces tels que définis dans la revendication 6 ou 7, par chauffage entre environ 80°C et environ 110°C, avantageusement à 100°C,

 - l'amplification proprement dite par addition au milieu obtenu à l'étape précédente d'ADN polymérase thermorésistante par exemple, et

* chauffage à environ 94°C, ce qui correspond à l'étape de dénaturation proprement dite,

5 * puis chauffage entre environ 60°C et environ 76°C, ce qui correspond à l'étape d'hybridation des couples d'amorces avec les gènes codant des PL, ou des fragments de ces gènes, susceptibles d'être présents dans l'échantillon biologique étudié,

10 * et enfin chauffage entre environ 50°C et environ 76°C, ce qui correspond à l'étape d'élongation des amorces, hybridées à l'étape précédente, l'une vers l'autre, produisant ainsi des séquences nucléotidiques complémentaires de tout ou partie des séquences génomiques des erwinias pectinolytiques, ces dernières séquences étant délimitées par les nucléotides s'hybridant avec les amorces sus-mentionnées,

15 - la répétition de l'étape d'amplification précédente entre environ 20 et environ 50 fois, avantageusement entre 25 et 35 fois.

 - le cas échéant, la récupération d'une partie aliquote du milieu obtenu à la fin de l'étape d'amplification précédente, afin de réaliser une nouvelle amplification selon la méthode décrite ci-dessus.

20 14. Application du procédé selon l'une des revendications 11 à 13, à la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic de l'éventuelle apparition de pathologies causées par les bactéries de l'espèce *Erwinia carotovora* et plus particulièrement par l'une des sous-espèces *Ecc*, *Eca*, *Eco* et *Ecw*, par les bactéries de l'espèce *Erwinia chrysanthemi*, ou de toute espèce, sous-espèce ou pathovar, actuels ou dérivés ultérieurement par modification de la taxonomie
25 actuelle.

 15. Kit pour la mise en oeuvre d'un procédé selon l'une des revendications 11 à 13, caractérisé en ce qu'il comprend:

30 - au moins un couple d'amorces selon la revendication 6, et/ou
 - au moins un couple d'amorces selon la revendication 7,
 - une (ou plusieurs) sonde(s) selon la revendication 8, et/ou une (ou plusieurs) sonde(s) selon la revendication 9, lesdites sondes étant susceptibles de s'hybrider avec tout ou partie des fragments de gènes amplifiés à l'aide des couples d'amorces selon les revendications 6 et 7 respectivement.

35

 16. Kit selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il comprend également:

 - une ADN ou ARN polymérase thermorésistante,

5 - un milieu réactionnel avantageusement constitué de Tris-HCl 10 mM pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% de gélatine, de co-facteurs de l'ADN-polymérase, notamment d'ions Mg²⁺ et K⁺, et des 4 désoxynucléotides constitutifs des ADN (dCTP, dATP, dGTP, dTTP) ou des ARN (dCTP, dATP, dGTP, dUTP) et/ou,

10 - une ou plusieurs enzymes de restriction, et, le cas échéant, des fragments de restriction de référence caractéristiques des sous-espèces d'*Erwinia carotovora* et/ou d'*Erwinia chrysanthemi*, notamment des fragments de restriction représentés sur la figure 3, dans le cas des sous-espèces d'*Erwinia carotovora* et/ou,

15 - une ligase et un (ou plusieurs) couple(s) de séquences oligonucléotidiques, susceptibles de s'hybrider de part et d'autre d'un (ou plusieurs) nucléotide(s) situé(s) dans des gènes ou fragment de gènes codant des pectate-lyases, et étant caractéristique(s) d'une espèce, sous-espèce ou pathovar d'*Erwinia*, et/ou

20 - une (ou plusieurs) sonde(s) oligonucléotidique(s) spécifique(s) d'une région nucléotidique caractéristique d'une espèce, sous-espèce ou pathovar déterminé de bactéries du genre *Erwinia*.

25 17. Utilisation de séquences nucléotidiques correspondant à tout ou partie de gènes qui, au sein des génomes des bactéries pectinolytiques du genre *Erwinia*, et plus particulièrement d'*Erwinia carotovora* et d'*Erwinia chrysanthemi*, codant des pectate-lyases, pour la mise en oeuvre d'un procédé d'identification des sous-espèces, et/ou des souches ou pathovars des espèces ou sous-espèces, des différentes bactéries du genre *Erwinia*.

1/3

ATGAAAAAAT	TTGCGCTGTC	GCTTCTTGCA	GGTCTGGTTG	CTTTACAGGC
CAGCGCCGCT	ACACCAGACC	GTCTCACTAT	CGTCAATCAG	TATGTTGACA
ACGTGCTGAC	CAAAGCCGGT	GACCAGTATC	ACGGTCAATC	ACCCACACCG
CTGCTCGCCG	ATGGTATCGA	TCCGCGTACT	GGCAAGCAGA	TGGAATGGAT
CTTCCCTGAC	GGCCGCCATG	CCGTGTTGTC	TAACCTTCTCC	GCGCAGCAAA
ACCTGATGCG	CGTGTGGTTC	GGGTAAAGTA	ACCTGAGCGG	CAACCCACAGC
TATAAGCAGC	GCGCCGAAGC	GATTGTGAAG	TATCACTTCC	AACACTATCA
GGATGAGAGC	GGCCTGCTGA	TTTGGGGCGG	TCACCGTTTC	GTTGATTTAA
AAACGCTGCA	ACCGGAAGGC	CCGAGCGAAA	AAGAGATGGT	GCATGAGCTG
AAAAATGCCT	ATCCCTACTA	CGATTTGATG	TTCAGCGTTG	ATAAAGAGGC
CACCGCACGC	TTTATCCGCG	GTTTCTGGAA	TGCGCACGTT	TATGACTGGA
AAATCATGGA	AACCAGTCGC	CACGGTAAAT	ACGGGCAAAA	AATGGGCGCG
CTCTGGCAAA	GTCCGTTTGA	GCAACAGCCG	CCCTTCTTCG	CCACCAAAGG
CCTCAGCTTC	CTGAATGCGG	GTAACGATCT	GATCTATTCC	GCCTCGCTGC
TGTACAAATA	CAATAAAGAA	GACGGCGCGC	TGGTCTGGGC	AAAACGCTCTG
GCACAGCAGT	ATGTGCTGCC	ACGGGATAAG	GCAACCGGGC	TTGGCGTGTA
TCAATTTACT	CAGGCGCTGA	AGCGTGATGA	AACCACCGAC	GATGCCGATA
CGCATTTCAA	ATATGGCGAT	CGCGCTCAGC	GCCAATTTGG	CCCAGAGTTC
GGCCCTACCG	CGCTGGAAGG	CAATATGATG	CTGAAAGGAC	GCACCAGTAC
GATCTATTCC	GAAAATGCGC	TCATGCAGCT	CCAGTTGGGT	AAAGATTTAG
GGGCGGAAGG	CAAGGAACTG	CTGACCTGGA	CAACCGATGG	ACTGAAAGCC
TTTGCCAAGT	ATGCCTACAA	CGAGTCCGAT	AACACGTTCC	GCCCGATGCT
GGCAAACGGC	AAAGATCTCT	CCAATTACGT	TCTGCCGCGT	GATGGCTACT
ACGGCAAAAA	AGGCACCGTG	ATCAAGCCTT	ATCCTGCGGA	TAACCTCATTC
CTGCTGTCGT	ATGCTCGCGC	CTATACCGTT	TTACCGGACG	CCGAGCTGTG
GCGTGTCGCA	CGCGGCATCG	CCCGTGACAA	GGGGCTGGGT	GAGTTAGGTT
CAGCGCCGGG	TAAAGACGTC	AAAGTGGATC	TCGCTACCAA	GAACAACGAT
CCTTACGCCT	TGTTGCGGCT	GCTGGATCTG	TATCAGGCGA	GCAAAGTGAA
AGACTATCTG	TCGCTGGCGG	AAAAGTGGG	CGATAACATT	ATCAGCACGC
GTTATAAGAA	CGGCTTCTTC	ATGGCCGATC	CCAACAGACA	ATATGCTGAT
GTCGATACCA	TCGAGCCTTA	TGCTCTGTTA	GCGCTGGAAG	CGGCGGTACG
CAATCAGCCA	CAGTCCGTTG	CCCCATTCC	GAATGGTGCG	GGCTTCACCG
AGGGCGGCTA	CCGTATGGAA	GACGGTTCAA	CTCGCATATC	TACTCGCGAT
AACGAAATCT	TCCTGCTGAA	CGTTGGCGAA	ACCTTGAAAC	CCAACAATAA
GAAGTAA				

FIGURE 1

2/3

ATGAAAA ACACGCGTGT ACGTTCCTATC GGAACATAAAA GTTTACTGGC
TGCCGTTGTA ACAGCAGCAC TGATGGCTAC CTCTGCTTAT GCGGCAGTAG
AAACTGATGC CGCAACAACCT GGCTGGGCAA CGCAAAACGG CGGCACTACC
GGTGGCGCAA AGGCAGCAAA AGCAGTTGAA GTAAAAAACA TTAGCGACTT
TAAAAAAGCC CTGAATGGAA CCGACTCATC AGCCAAAATC ATCAAAGTAA
CAGGGCCGAT TGATATCAGT GCGGGCAAAG CCTACACCAG TTTCGATGAT
CAGAAAGCGC GTAGCCAGAT CAGCATTCCG TCCAATACCA CCATTATCGG
TGTTGGCAGC AATGGTAAAT TCACCAACGG TTCTCTGGTG ATCAAAGGCG
TAAAAAACGT TATCCTGCGT AACCTGTATA TTGAAACGCC GGTAGACGTA
GCACCGCATT ATGAAAGTGG GGATGGCTGG AACGCCGAGT GGGATGCAGC
CGTTATCGAC AACTCTACCA ACGTCTGGGT TGACCACGTC ACCATCAGCG
ATGGTAGCTT CACCGACGAC AAATACACCA CCAAAGATGG TGAAAAATAC
GTTTCAGCAG ACGGCGCACT GGATATCAAG AAAGGGTCTG ACTACGTCAC
CATTTCTTAC AGCCGCTTCG AACTGCACGA CAAAACCTATC CTGATCGGCC
ACAGCGACAG CAACGGCTCT CAGGATTCCG GCAAACCTGCG CGTCACCTTC
CACAAACAG TGTTGACCG CGTGACTGAA CGTGCCCCGC GCGTACGTTT
CGGTAGCATC CACGCTTACA ACAACGTTTA TCTGGGCGAC GTGAAACACA
GCGTCTATCC GTACCTGTAC AGCTTCGGCC TGGGCACCAG CGGCAGCATC
CTGTCTGAGT CCAACTCCTT CACGCTCTCC AACCTGAAGA GCATTGATGG
TAAAAACCCA GAATGTAGCA TCGTGAAGCA ATTCAACAGC AAGGTGTTCT
CCGATAAAGG CTCACTGGTT AACGGCTCAA CCACCACCAA GCTGGATACC
TGTGGTCTGA CGGCGTACAA ACCGACTCTG CCGTACAAAT ATTCGGCTCA
GACCATGACC AGCAGCCTGG CTACCAGCAT CAACAACAAC GCAGGTTACG
GCAAACGTGA A

FIGURE 2

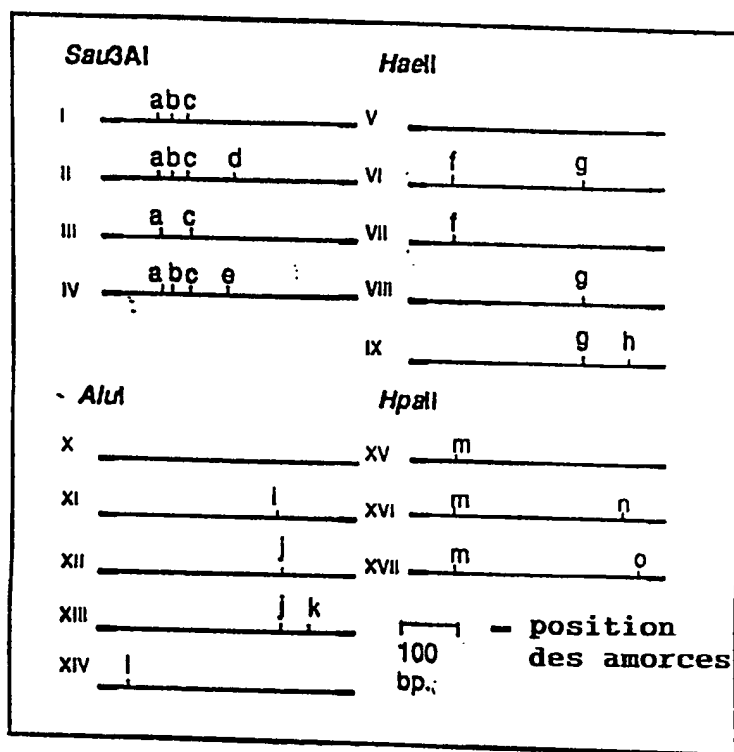


FIGURE 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR93/00540

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁵ : C12Q 1/68; C07K 15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁵ : C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIOLOGICAL ABSTRACTS Vol. 90, No. 11, 1990, Philadelphia, PA, US; abstract No. 127177, see abstract & PLANT SOIL 125 (2). 1990. 285-287. FENNINGTON G J; HUGHES T A "ERWINIA PEL GENE HOMOLOGY SURVEY IN SELECTED BACTERIA". ---	1,17
Y	EP, A, 0409159 (SHIMADZU CORP.) 23 January 1991 see abstract; claims ---	1-17
Y	DE, A, 3419382 (D. KNÖSEL) 28 November 1985 see abstract see page 10 ---	1-17
Y	BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 168 (2). 1990. 801-808. NISHIDA T; SUZUKI T; ITO K; KAMIO Y; IZAKI K "CLONING AND EXPRESSION OF PECTIN LYASE GENE FROM ERWINIA -CAROTOVORA IN ESCHERICHIA-COLI." see the whole document --- ./.	1-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 October 1993 (20.10.93)

Date of mailing of the international search report

03 November 1993 (03.11.93)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR93/00540

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>GENE. Vol. 62, 1988, AMSTERDAM NL pages 159 - 164 S. P. LEI ET AL. "Characterization of the Erwinia carotovora pe1A gene and its product pectate lyase A" (cited in the application) see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-17
P,X	<p>Week 9240, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 92-321179 & JP, A, 4229176 (SHIMADZU) 18 August 1992 see abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,17

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9300540
SA 75084

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

20/10/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0409159	23-01-91	JP-A- 3049698	04-03-91
		JP-A- 3049700	04-03-91
		JP-A- 3112498	14-05-91

DE-A-3419382	28-11-85	None	

EPO FORM P0479

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 93/00540

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB 5 C12Q1/68; C07K15/00		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C12Q	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie ^o	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
X	BIOLOGICAL ABSTRACTS vol. 90, no. 11 , 1990, Philadelphia, PA, US; abstract no. 127177, voir abrégé & PLANT SOIL 125 (2). 1990. 285-287. FENNINGTON G J; HUGHES T A 'ERWINIA PEL GENE HOMOLOGY SURVEY IN SELECTED BACTERIA'	1, 17
Y	EP,A,0 409 159 (SHIMADZU CORP.) 23 Janvier 1991 voir abrégé; revendications	1-17
Y	DE,A,3 419 382 (D. KNÖSEL) 28 Novembre 1985 voir abrégé voir page 10	1-17

-/--		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>^o Catégories spéciales de documents cités:¹¹</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
20 OCTOBRE 1993		0 3. 11. 93
Administration chargée de la recherche internationale		Signature du fonctionnaire autorisé
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS		MOLINA GALAN E.

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS¹⁴(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR LA
DEUXIEME FEUILLE)

Catégorie °	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
Y	BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 168 (2). 1990. 801-808. NISHIDA T; SUZUKI T; ITO K; KAMIO Y; IZAKI K 'CLONING AND EXPRESSION OF PECTIN LYASE GENE FROM ERWINIA -CAROTOVORA IN ESCHERICHIA-COLI.' voir le document en entier ---	1-17
Y	GENE. vol. 62, 1988, AMSTERDAM NL pages 159 - 164 S. P. LEI ET AL. 'Characterization of the Erwinia carotovora pelA gene and its product pectate lyase A' cité dans la demande voir le document en entier ---	1-17
P,X	Week 9240, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 92-321179 & JP,A,4 229 176 (SHIMADZU) 18 Août 1992 voir abrégé -----	1,17

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9300540
SA 75084

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

20/10/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0409159	23-01-91	JP-A- 3049698	04-03-91
		JP-A- 3049700	04-03-91
		JP-A- 3112498	14-05-91

DE-A-3419382	28-11-85	Aucun	

EPO FORM P0072

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.